

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 10 月 10 日 (10.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/079253 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/82, A61K 38/00, 39/00, A61P 35/00, C07K 7/04, C12N 5/06
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/02794
- (22) 国際出願日: 2002 年 3 月 22 日 (22.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-83250 2001 年 3 月 22 日 (22.03.2001) JP
- (71) 出願人および  
(72) 発明者: 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒562-0036 大阪府箕面市船場西 2-19-30 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 石田 敏, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: WTI MODIFIED PEPTIDE

(54) 発明の名称: WT 1 改変ペプチド

(57) Abstract: A cancer antigen peptide containing the following amino acid sequence Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu (SEQ ID NO:3); a vaccine for cancer containing the same as the active ingredient; and a DNA vaccine containing a DNA encoding this peptide as the active ingredient.

(57) 要約:

次のアミノ酸配列 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 3) を含んで成る癌抗原ペプチド、及びこれを有効成分とする癌ワクチン、並びにこのペプチドをコードする DNA を有効成分とする DNA ワクチン。

WO 02/079253 A1

---

**WO2002079253**

Publication Title:

No title available

Abstract:

Abstract not available for WO2002079253 Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----  
Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

## 明 細 書

### W T 1 改変ペプチド

#### 発明の分野

本発明は、W i l m s 腫瘍の癌抑制遺伝子 W T 1 の産物に基づく癌抗原に関する。この癌抗原は、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髓腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、又は固形癌、例えば胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等、並びにさらには W T 1 を発現するすべての癌に対する抗癌ワクチンとして有用である。

#### 背景技術

異物を排除するための免疫機構には、一般に、抗原を認識して抗原提示細胞として機能するマクロファージ、該マクロファージの抗原提示を認識して種々のリンホカインを産生して他の T ー細胞等を活性化するヘルパー T ー細胞、該リンホカインの作用により抗体産生細胞に分化する B ーリンパ球等が関与する液性免疫と、抗原の提示を受けて分化したキラー T ー細胞（細胞傷害性 T 細胞（C T L）とも称する）が標的細胞を攻撃し破壊する細胞性免疫とがある。

現在のところ、癌の免疫は主として、キラー T ー細胞が関与する細胞性免疫によるものと考えられている。キラー T ー細胞による癌免疫においては、主要組織適合抗原（Major Histocompatibility C omplex; MHC）クラス I （MHC クラス I 抗原、ヒトの場合は H L A 抗原と呼ばれる）と癌抗原との複合体の形で提示された癌抗原を認識した前駆体 T ー細胞が分化増殖して生成したキラー T ー細胞が癌細胞を攻撃し、破壊する。この際、癌細胞は MHC クラス I 抗原

と癌抗原との複合体をその細胞表面に提示しており、これがキラー T-細胞の標的とされる (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev, 146, 167, 1995)。

標的細胞である癌細胞上に MHC クラス I 抗原により提示される前記の癌抗原は、癌細胞内で合成された抗原蛋白質が細胞内プロテアーゼによりプロセッシングされて生成した約 8 ～ 12 個のアミノ酸から成るペプチドであると考えられている (Cur. Opin, Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995)。

現在、種々の癌について抗原蛋白質の検索が行われているが、癌特異抗原として証明されているものは少ない。

Wilms 腫瘍の癌抑制遺伝子 WT1 (WT1 遺伝子) は、Wilms 腫瘍、無紅彩、泌尿生殖器異常、精神発達遅滞などを合併する WAGR 症候群の解析から Wilms 腫瘍の原因遺伝子の 1 つとして染色体 11p13 から単離された (Gessler, M. ら、Nature, Vol. 343, p.774-778(1990)) ものであり、ゲノム DNA は約 50 kb で 10 のエキソンから成り、その cDNA は約 3 kb である。cDNA から推定されるアミノ酸配列は、配列番号: 1 に示す通りである (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991)。

WT1 遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞を WT1 アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平 9-104627 号公報) ことなどから、WT1 遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1 遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特願平 9-191635)、WT

1 遺伝子は白血病及び固形癌における新しい腫瘍マーカーであることが判明した。

WO 00/06602には、WT1 遺伝子発現生成物の部分から成る幾つかの癌特異抗原ペプチドが記載されており、その内の有望なものとしてD<sup>b</sup>と称し、次のアミノ酸配列：Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)(本発明において「WT1 ワイルドペプチド」と称する)が記載されている。

#### 発明の開示

従って、本発明は、すでに知られている癌特異抗原ペプチドに比べてより活性が高く、癌ワクチンとして有望なペプチドを提供しようとするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、すでに知られている上記のアミノ酸配列(配列番号：2)の2番目のアミノ酸MetをTyrに変更したアミノ酸配列：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)を有するペプチド(「WT1 改変ペプチド」と称する)がより高い活性を有することを見出し、本発明を完成した。

従って本発明は、次のアミノ酸配列：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)を含んで成り、9～30個のアミノ酸から成るペプチド(WT1 改変ペプチド)を提供する。配列番号：3に示すアミノ酸配列を含む、9～12個のアミノ酸からなるポリペプチドが好ましく、配列番号：3に示すアミノ酸配列から成るペプチドがさらに好ましい。

本発明はさらに、上記のWT1 改変ペプチドを有効成分とする癌ワクチンを提供する。

本発明はさらに、上記のペプチドをコードするDNAを有効成分

とする、癌に対するDNAワクチンを提供する。

本発明はさらに、HLA抗原（MHCクラスI抗原）と上記ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞を提供する。

本発明はさらに、HLA抗原と上記ペプチドとの複合体を認識する細胞傷害性T細胞を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、WT1ワイルドペプチド（配列番号：2）又は本発明のWT1改変ペプチド（配列番号：3）により刺激されたエフェクター細胞（E）による、ペプチドでパルスされているか又はパルスされていないC1R2402標的（ターゲット）細胞（T）の殺細胞効果（比細胞溶解活性）を示すグラフである。図中、黒丸は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R2402標的細胞に対する、WT1改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、黒四角は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R2402標的細胞に対する、WT1ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、中空丸は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R2402標的細胞に対する、WT1改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、そして中空四角は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R2402標的細胞に対する、WT1ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示す。

図2は、WT1ワイルドペプチド又は本発明のWT1改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、内因性にWT1抗原を発現している急性骨髄性白血病細胞又は発現していない急性骨髄性白血病細胞に対する細胞溶解活性を示すグラフである。

図3は、WT1 ワイルドペプチド又は本発明のWT1 改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、ペプチドをパルスされているか又はパルスされていないC1R 2 4 0 2 標的細胞の殺細胞効果（比細胞溶解活性）を示すグラフである。図中、黒丸は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R 2 4 0 2 細胞に対する、WT1改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、黒四角は、ワイルドペプチドによりパルスされたC1R 2 4 0 2 標的細胞に対する、WT1ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、中空丸は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R 2 4 0 2 標的細胞に対する、WT1 改変ペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示し、そして中空四角は、ワイルドペプチドによりパルスされていないC1R 2 4 0 2 標的細胞に対する、WT1 ワイルドペプチドで刺激されたエフェクター細胞による細胞溶解効果を示す。

図4は、WT1 ワイルドペプチド又は本発明のWT1改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、内因性にWT1 を発現している肺癌細胞株又は発現していない肺癌細胞株に対する細胞溶解活性を示すグラフである。

図5は、WT1 ワイルドペプチド又は本発明のWT1 改変ペプチドにより刺激されたエフェクター細胞による、ワイルドペプチドをパルスされているC1R 2 4 0 2 標的細胞の殺細胞効果（比細胞溶解活性）に対する抗HLAクラスI 抗体、抗HLAクラスII 抗体、抗CD8 抗体の阻害効果を示すグラフである。

#### 発明の実施の形態

本発明のペプチドは、配列番号：3 に示す9 個のアミノ酸から成

るアミノ酸配列を含み、9～30個のアミノ酸から成るペプチドである。さらにHLA抗原に結合して提示されるという観点から、配列番号：3に示すアミノ酸配列を含み、アミノ酸9～12個から成るペプチドが好ましい。その際、HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）を有するペプチドが、より好ましい（J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41:p178, 1995, J. Immunol., 155:p4307, 1994, J. Immunol., 155:p4749, 1995）。さらに、配列番号：3に示す9個のアミノ酸のアミノ酸配列から成るペプチドが最も好ましい。

なお、前記で「配列番号：3に示すアミノ酸配列を含むペプチド」とは、具体的には、例えば、配列番号：3に示すアミノ酸配列を含み、WT1（配列番号：1）上の該当位置（第235位～第243位）、又はヒトWT1（NCBIデータベースAccession No. XP012009）上の対応位置よりN末端方向及び／又はC末端方向に伸長したペプチドであって、かつ癌抗原ペプチドとしての活性を有するものが挙げられる。

本発明の癌抗原ペプチドの活性測定法としては、例えばJ. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法が挙げられる。以下、本方法の概略につき、HLAの型がHLA-A24の場合を例にとり説明する。まず、HLA-A24抗原陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離する。次に、この末梢血リンパ球に対してin vitroで本発明のペプチドを添加して刺激することにより、本発明のペプチドとHLA-A24との複合体の提示された抗原提示細胞を特異的に認識するCTL（細胞傷害性T細胞）を誘導する。

当該CTLの誘導は、例えば、抗原ペプチドとHLA-A24との複合体に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）の量を、例えばELISA法によって測定することにより、調



べることができる。また、 $^{51}\text{Cr}$ やEuropiumで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法 ( $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイ、Int. J. Cancer. 58, p317, 1994、Europiumリリースアッセイ、J. Immunol., 154, p3991, 1995) によっても調べることができる。さらに、後述の実施例を参考にして行うこともできる。

本発明はまた前記抗原を有効成分とする癌ワクチンに関する。このワクチンは、WT1遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液の癌、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防又は治療のために使用することができる。特にこのワクチンは、HLA-A24陽性の患者に適用し得るものである。このワクチンは、経口投与、又は非経口投与、例えば腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与等により投与することができる。

さらに、本発明のワクチンの投与方法として、患者の末梢血から単核球を集め、その中から樹状細胞を取り出し、本発明のペプチドをパルスして患者に皮下投与などで患者に戻す方法も行われる。

本方法は、細胞療法、あるいはDC（樹状細胞）療法とも呼ばれるものであり、詳しくは後述の「抗原提示細胞」の項を参照されたい。

ワクチンは、前記有効成分としての投与ペプチドのほかに、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバンド (Clin-Micobiol. Rev., 7, 277-289, 1994)、例えば水酸化アルミニウムのごとき鉱物ゲル；リソレシチン、プルロニックポリオールのごとき界面活性剤；ポリアニオン；ペプチド；又は油乳濁液を含むことができる。あるいは、リポゾーム中へ混合し、又は多糖及び／又はワ

クチン中に配合される他の集合体を含むことができる。投与量は一般に、1日当り0.1  $\mu$ g ~ 1mg/kgである。

本発明ではまた、上記のポリペプチドワクチンをコードするDNAもワクチン（DNAワクチン）として使用することができる。すなわち、本発明のWT1改変ペプチドをコードする核酸を含有する核酸、好ましくはDNAを、適切なベクター、好ましくは発現ベクターに挿入した後、動物に投与することにより、癌免疫を生じさせることができる。このようなDNAワクチンの具体的手法については、WO 00/06602やJ. Immunol., 160, P1717, 1998などを参照されたい。

本発明はまた、HLA抗原と上記ペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞に関する。実施例において、本発明のペプチド刺激により強いcell Killing活性が認められているが、これは、末梢血単核球中に、本発明のペプチドとHLA抗原（HLA-A24抗原）との複合体の提示された抗原提示細胞が存在し、そして、この抗原提示細胞を特異的に認識するCTL（細胞傷害性T細胞）が誘導された結果に他ならない。このような、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞は、以下に述べるような細胞療法（DC療法）において有効に用いられる。

細胞療法において用いられる抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、この細胞に本発明のペプチドを体外でパルスして、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を細胞表面に提示させることにより作製される。ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示することの可能なHLA抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、抗原提示能が高いとされている樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞にパルスされる本発明のペプ

チドは、ペプチドの形態のみならず、当該ペプチドをコードするDNAやRNAの形態であっても良い。

本発明の抗原提示細胞の具体的な調製法としては、例えばCancer Immunol Immunother., 46: 82, 1998、J. Immunol., 158, p1796, 1997、Cancer Res., 59, p1184, 1999などを参考にすることができる。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフイコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に、本発明のペプチドをコードするDNAやRNAを導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、例えばDNAの場合はCancer Res., 56: p 5672, 1996やJ. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができ、またRNAの場合は、J. Exp. Med., 184: p 465, 1996などを参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞は、腫瘍の治療剤の有効成分とすることができる。その際、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。

本発明はさらに、HLA抗原と上記ペプチドとの複合体を認識する細胞傷害性T細胞(CTL)に関する。本発明のCTLは、以下の養子免疫療法において有効に用いられる。

すなわちメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J. Natl. Cancer. Inst., 86: 1159, 1994)。

またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のペプチドを用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

このように本発明のCTLは、腫瘍の治療剤の有効成分とすることができる。その際、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。

#### 実施例

次に、実施例により、本発明のペプチドが癌抗原及び癌ワクチンとして有用なことを、明らかにする。

##### 実施例 1.

HLA-A\*2402を有するヒトの末梢血単核球を分離し、これを24ウェルプレートに $2 \times 10^6$ 細胞/ウェルの量で分配し、これにWT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドを $20 \mu\text{M}$ の濃度になるように添加し、1週間培養した。この際の培地として、45%RPMI、45%AIV、10%FCS、1×非必須アミノ酸、SM/PCGを用いた。上記の培養の後、細胞を $2 \times 10^6$ 細胞/ウェルに調製し、レスポンドー(responder)細胞とした。

他方、上記の同じHLA-A\*2402のヒトから、別途、末梢

血単核球を分離し、前記それぞれ一方のペプチド  $20 \mu\text{M}$  と共に 4 時間培養してペプチドパルスし、次に  $30 \text{ Gy}$  の放射線照射した後、細胞を  $4 \times 10^6$  細胞/ウェルに調製し、スチムレーター (stimulator) 細胞とした。

上記のようにして調製したレスポonder細胞とスチムレーター細胞を混合し、さらに  $\text{IL-2}$  を  $50 \text{ U/ml}$  の濃度で加えて 1 週間培養した。この結果、得られた細胞の状態は次の通りであった。

表 1

ペプチド	細胞数	CD4	CD8
WT1ワイルドペプチド	$2.4 \times 10^6$ / ウェル	5%	35%
WT1改変ペプチド	$3.0 \times 10^6$ / ウェル	18%	38%

次に、 $^{51}\text{Cr}$  リリース法に従って Killing assay を行った (J. Immunol. 164:1873, 2000)。標的細胞として、C1R2402 細胞、及び上記のペプチドでパルスした C1R2402 細胞を用い、これらのそれぞれの標的細胞 (T) に、上記の通りに WT1 ワイルドペプチド又は WT1 改変ペプチドにより刺激した細胞 (エフェクター細胞) (E) を、E : T 比 1、5 又は 20 において作用させ、細胞溶解を測定した。結果を図 1 に示す。この図から明らかな通り、WT1 ワイルドペプチドにより刺激した細胞に比べて WT1 改変ペプチドで刺激した細胞の方が強い cell killing 活性を示した。

#### 実施例 2.

内因性 (endogeneous) に WT1 抗原を発現する白血病細胞 (標的細胞) に対する、WT1 ワイルドペプチド又は WT1 改変ペプチドにより刺激したエフェクター細胞の cell killing 活性を  $^{51}\text{Cr}$  リリース法により試験した。標的細胞として WT1 + / A\*2402 + 細胞 (#1 AML 患者の白血病細胞)、WT1 - / A\*2402 +

細胞（＃２ＡＭＬ患者の白血病細胞）、ＷＴ１＋／Ａ＊２４０２－細胞（＃３ＡＭＬ患者の白血病細胞）、及びＷＴ１－／Ａ＊２４０２－細胞（＃４ＡＭＬ患者の白血病細胞）を用いた。

実施例１で調製したエフェクター細胞（Ｅ）と上記の標的細胞（Ｔ）とを、Ｅ／Ｔ比２０：１で混合し、４時間培養し、細胞溶解の程度を測定した。結果を図２に示す。

この図から明らかな通り、ＷＴ１ワイルドペプチド又はＷＴ１改変ペプチドにより刺激された細胞のいずれもＷＴ１＋／Ａ＊２４０２細胞に対して細胞毒性活性を示したが、その活性はＷＴ１改変ペプチドの方が高かった。

#### 実施例３．

実施例１と同様の実験を別のＨＬＡ－Ａ＊２４０２陽性の健常人の末梢血単核球から調製したエフェクター細胞を用いて試験した。結果を図３に示す。

この図から明らかな通り、実施例１と同様にＷＴ１ワイルドペプチドにより刺激した細胞に比べてＷＴ１改変ペプチドにより刺激された細胞の方が強い細胞傷害活性を示した。

#### 実施例４．

ＷＴ１ワイルドペプチド又はＷＴ１改変ペプチドで刺激したエフェクター細胞の内因性（endogeneous）にＷＴ１抗原を発現する肺癌由来の癌細胞株（標的細胞）に対する細胞傷害活性を<sup>51</sup>Ｃｒリリース法に従って試験した。標的細胞としてRERF-LCAI（ＷＴ１＋／Ａ＊２４０２＋）、ＬＣ１ｓｑ（ＷＴ１＋／Ａ＊２４０２＋）、１１－１８（ＷＴ１－／Ａ＊２４０２＋）、ＬＫ８７（ＷＴ１＋／Ａ＊２４０２－）を用いた。

実施例１と同様な方法により調製したエフェクター細胞（Ｅ）と<sup>51</sup>Ｃｒで標識した上記の標的細胞（Ｔ）とを、実施例２と同様にＥ

／T比20：1で混合して4時間培養し、細胞溶解の程度を測定した。結果を図4に示す。

この図から明らかな通り、WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドにより刺激された細胞のいずれもWT1+／A\*2402+の標的細胞に対してのみ細胞傷害活性を示したが、その活性はWT1改変ペプチドの方が高かった。

#### 実施例5.

WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドで刺激したエフェクター細胞がHLAクラスIに拘束性のCD8陽性キラー細胞であることを抗体を用いたブロックングアッセイにより確かめた。抗体としては、抗HLAクラスI抗体、抗HLAクラスII抗体、抗CD8抗体を用いた。実施例1と同様な方法により調製したエフェクター細胞(E)、<sup>51</sup>Crで標識したC1R2402又はWT1ワイルドペプチドをパルスしたC1R2402細胞を標的細胞(T)とし、E／T比20：1で抗体とともに混合して4時間培養し、<sup>51</sup>Crリリース法に従って細胞溶解の程度を測定した。結果を図5に示す。

この図から明らかな通り、WT1ワイルドペプチド又はWT1改変ペプチドにより刺激された細胞のいずれも抗HLAクラスI抗体及び抗CD8抗体により細胞傷害活性が阻害されており、細胞傷害活性を示す細胞は、HLAクラスIに拘束性のCD8陽性キラー細胞であることが示された。

#### 実施例6.

WT1改変ペプチドとWT1ワイルドペプチドのHLA-A\*2402への結合親和性を調べた。C1RA2402細胞を酸緩衝液(131mMクエン酸、66mMリン酸ナトリウム、290mosmol、pH3.3)で1分間処理した後、0.5%のウシ血清アルブミンを含むDMEM培養液を加えて中和した。細胞は、培養液で洗浄

した後、200 nMの $\beta 2$ -マイクログロブリン（シグマ社）と0.5%のウシ血清アルブミンを含むDMEM培養液で $2 \times 10^6$ 細胞/mlの濃度に懸濁した。15  $\mu$ lの細胞懸濁液を各種濃度のWT1ペプチドを含む50  $\mu$ lの培養液と混合し、室温で4時間インキュベートした。細胞は洗浄後、FITCで標識したHLA-A24に対するモノクローナル抗体（クローン名7A12）で染色し、フローサイトメーターFACSでHLA-A24発現量を解析した。同様の操作をHLA-A\*2402に結合することが報告されているメラノーマ抗原のpmel15の抗原ペプチド（Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu）（配列番号：4）（J. Immunol., 154:5994, 1995）についても行い、これをスタンダードとして、文献（Immunogenetics, 51:816, 2000）に記載の方法によりWT1ペプチドの解離定数（ $K_d$ ）を算出した。結果を表2に示す。

表2

ペプチド	解離定数 $K_d$ (M)
WT1ワイルドペプチド	$1.82 \times 10^{-6}$
WT1改変ペプチド	$6.40 \times 10^{-7}$

この表から明らかな通り、WT1改変ペプチドはWT1ワイルドペプチドよりもHLA-A\*2402への結合親和性が強かった。

#### 産業上の利用可能性

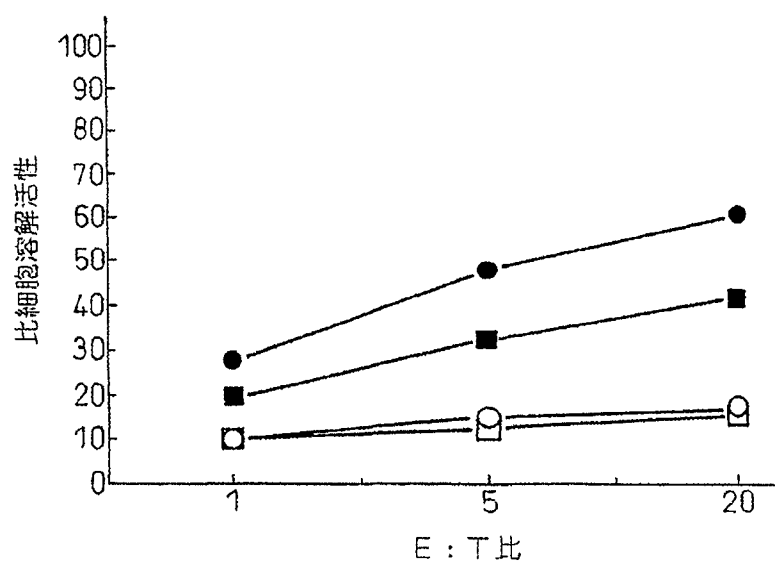
上記の結果から、本発明のペプチドは確かに癌抗原として機能し、癌細胞に対するキラーT-細胞（癌細胞傷害性T細胞）を誘導増殖させたことが立証された。従って、本発明の癌抗原ペプチドは、WT1遺伝子の発現の上昇を伴う白血病及び固形癌に対する癌ワク



## 請 求 の 範 囲

1. 次のアミノ酸配列：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)を含み、9～30個のアミノ酸から成るペプチドを活性成分とする癌抗原ペプチド。
2. 配列番号：3に示すアミノ酸配列を含む9～12個のアミノ酸から成る、請求項1に記載の癌抗原ペプチド。
3. 配列番号：3に示すアミノ酸配列から成る、請求項1に記載の癌抗原ペプチド。
4. 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドを有効成分とする癌ワクチン。
5. 請求項1～3のいずれか1項に記載のペプチドをコードするDNAを有効成分とする、癌に対するDNAワクチン。
6. HLA抗原と請求項1～3いずれか1項に記載のペプチドとの複合体の提示された抗原提示細胞。
7. HLA抗原と請求項1～3いずれか1項に記載のペプチドとの複合体を認識する細胞傷害性T細胞。

Fig.1



- [ WT 1 改変ペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルス C 1 R 2402 標的細胞
- [ WT 1 ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルス C 1 R 2402 標的細胞
- [ WT 1 改変ペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルスなし C 1 R 2402 標的細胞
- [ WT 1 ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルスなし C 1 R 2402 標的細胞

Fig.2

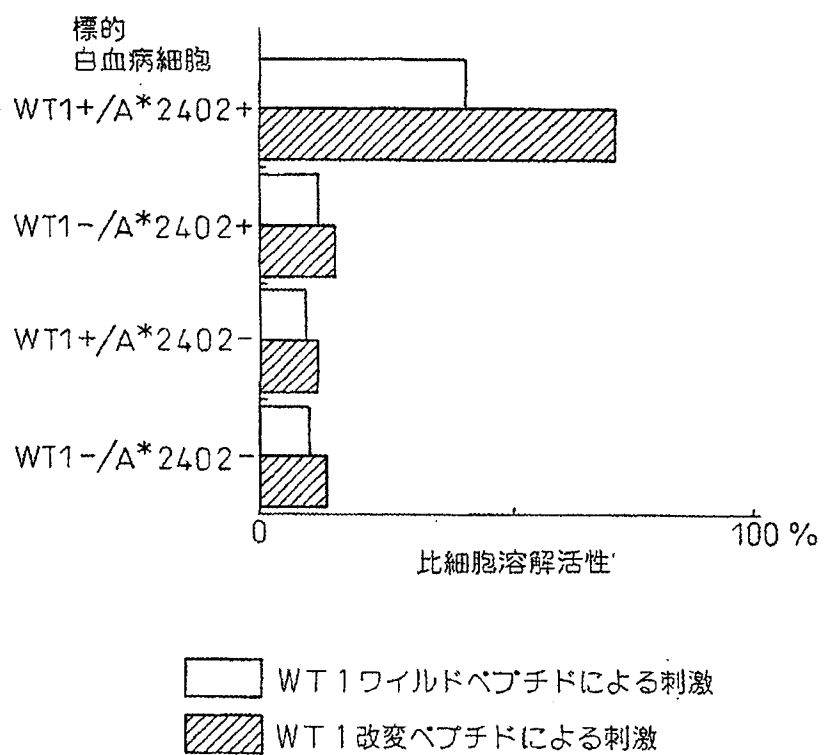
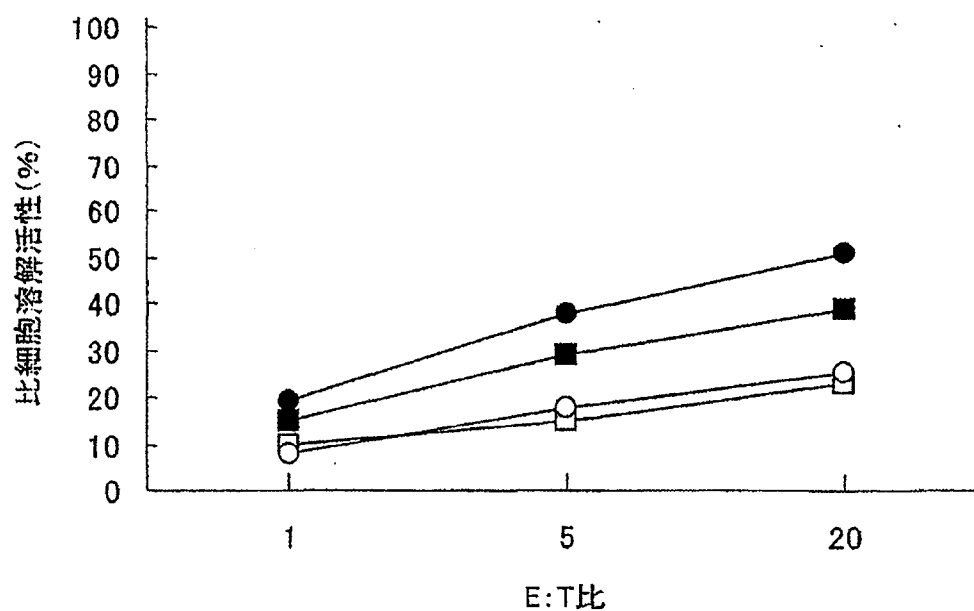


Fig.3



- [ WT1改変ペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルスC1R2402標的細胞
- [ WT1ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルスC1R2402標的細胞
- [ WT1改変ペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルスなしC1R2402標的細胞
- [ WT1ワイルドペプチド刺激エフェクター細胞  
ワイルドペプチドパルスなしC1R2402標的細胞

Fig.4

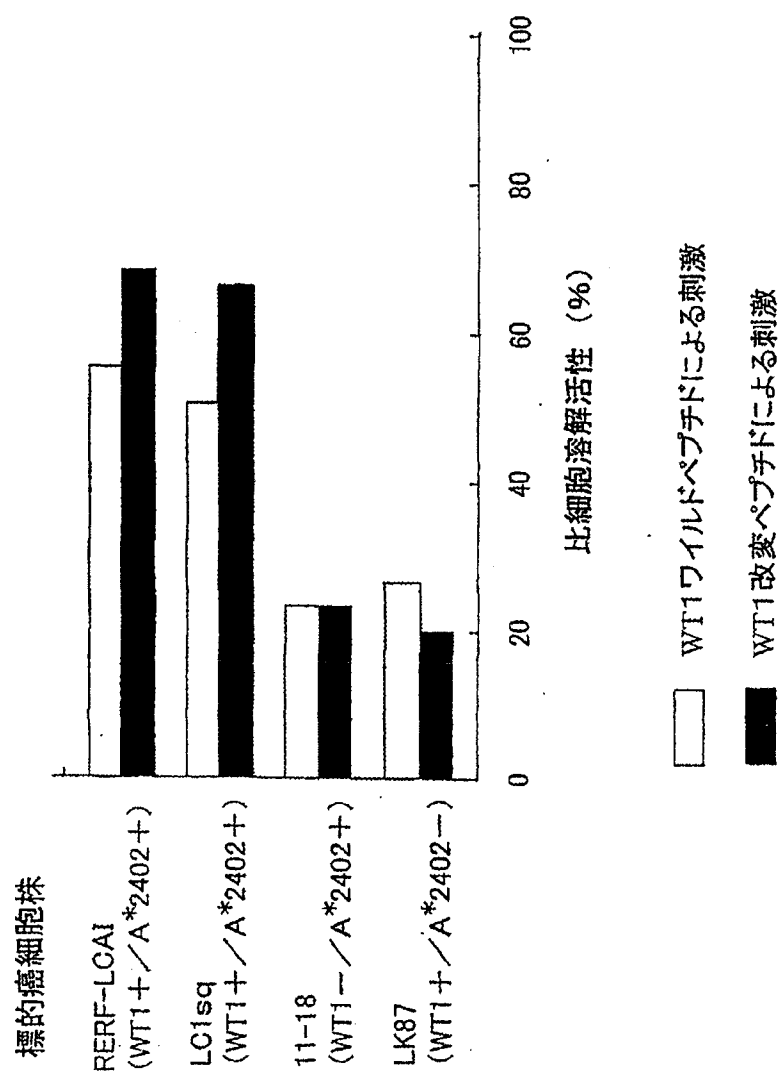
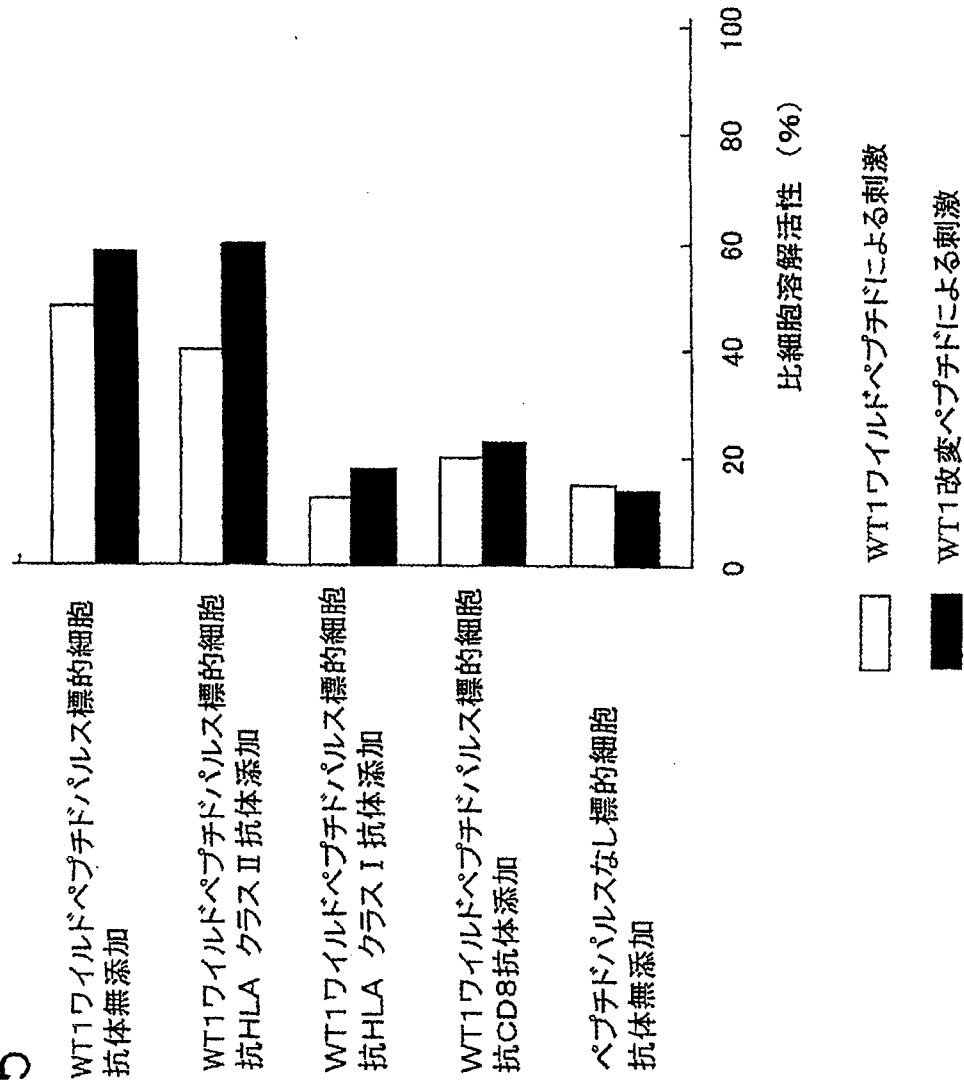


Fig.5



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt;

&lt;120&gt; modified WT1 peptide

&lt;130&gt; J 9 3 9

&lt;150&gt; J P 2 0 0 1 - 8 3 2 5 0

&lt;151&gt; 2 0 0 1 - 0 3 - 2 2

&lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4 4 9

&lt;212&gt; P R T

&lt;213&gt; M o u s e

&lt;400&gt; 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala

20

25

30

Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala

35

40

45

Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro

50

55

60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe

85

90

95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe

100

105

110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Thr Ile  
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr  
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Gln His Ser Phe  
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu  
260 265 270

Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser  
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
305 310 315 320



Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
                   325                                  330                                  335  
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
                   340                                  345                                  350  
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
                   355                                  360                                  365  
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
                   370                                  375                                  380  
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
 385                                  390                                  395                                  400  
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
                   405                                  410                                  415  
 Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
                   420                                  425                                  430  
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu His Val Ala  
                   435                                  440                                  445

Leu

449

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 9

< 2 1 2 > P R T

< 2 1 3 > A r t i f i c i a l   S e q u e n c e

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > S y n t h e t i c   P e p t i d e

< 4 0 0 > 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5  
<210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic Peptide  
<400> 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1 5  
<210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221>  
<222>  
<223> Antigenic Peptide  
<400> 4

Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu

1 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02794

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/82, A61K38/00, A61K39/00, A61P35/00, C07K7/04, C12N5/06</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>												
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/82, C07K7/04, C12N5/06, C12N15/09</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, SwissProt/PIR/GenSeq</p>												
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X A</td> <td>WO 00/26249 A1 (Imperial College Innovations Ltd.), 11 May, 2000 (11.05.00), Claims &amp; AU 9964797 A &amp; EP 1127068 A1</td> <td>7 1-6</td> </tr> <tr> <td>X A</td> <td>WO 00/18795 A2 (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Claims &amp; AU 9964078 A &amp; EP 1117687 A2 &amp; BR 9914116 A &amp; CN 1336935 A &amp; NO 200101613 A &amp; KR 2001085861 A &amp; HU 200103598 A2</td> <td>7 1-6</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X A	WO 00/26249 A1 (Imperial College Innovations Ltd.), 11 May, 2000 (11.05.00), Claims & AU 9964797 A & EP 1127068 A1	7 1-6	X A	WO 00/18795 A2 (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Claims & AU 9964078 A & EP 1117687 A2 & BR 9914116 A & CN 1336935 A & NO 200101613 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2	7 1-6	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X A	WO 00/26249 A1 (Imperial College Innovations Ltd.), 11 May, 2000 (11.05.00), Claims & AU 9964797 A & EP 1127068 A1	7 1-6										
X A	WO 00/18795 A2 (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Claims & AU 9964078 A & EP 1117687 A2 & BR 9914116 A & CN 1336935 A & NO 200101613 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2	7 1-6										
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>												
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
<p>Date of the actual completion of the international search  14 June, 2002 (14.06.02)</p>		<p>Date of mailing of the international search report  25 June, 2002 (25.06.02)</p>										
<p>Name and mailing address of the ISA/  Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>										
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02794

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/06602 A1 (Haruo SUGIYAMA), 10 February, 2000 (10.02.00), Full text & AU 9949321 A & BR 9912663 A & EP 1103564 A1 & JP 2000-562398 A & CN 1314916 A & KR 2001072112 A	1-7
A	OKA, Y. et al., Cancer Immunotherapy Targeting Wilms' Tumor Gene WT1 Product, J.Immunol. (2000) Vol.164, pages 1873 to 1880	1-7
A	Keiko TADOKORO, "Gan Yokusei Idenshi WT1 no Kino Hatsugen", Gendai Kagaku extra issue 33 "Gan Idenshi Kenkyu no Tenbo II" (1997), pages 92 to 98	1-7
A	WO 96/38176 A1 (Chuzo KISHIMOTO), 05 December, 1996 (05.12.96), Full text & AU 9657796 A & JP 9-104629 A & EP 841068 A1 & US 6034235 A	1-7

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/02794

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07K 14/82, A61K 38/00, A61K 39/00, A61P 35/00, C07K 7/04, C12N 5/06		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07K 14/82, C07K 7/04, C12N 5/06, C12N 15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST774IN (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 00/26249 A1 (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD) 2000. 05. 11, 特許請求の範囲 & AU 9964797 A & EP 1127068 A1	<u>7</u> 1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14. 06. 02	国際調査報告の発送日 25.06.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 北村 弘樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 00/18795 A2 (CORIXA CORP) 2000. 04. 06, 特許請求の範囲 & AU 9964078 A & EP 1117687 A2 & BR 9914116 A & CN 1336935 A & NO 200101613 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2	<u>7</u> 1-6
A	WO 00/06602 A1 (杉山治夫) 2000. 02. 10, 全文 & AU 9949321 A & BR 9912663 A & EP 1103564 A1 & JP 2000-562398 A & CN 1314916 A & KR 2001072112 A	1-7
A	OKA, Y. et al. Cancer Immunotherapy Targeting Wilms' Tumor Gene WT1 Product, J. Immunol. (2000) Vol. 164, p. 1873-1880	1-7
A	田所恵子、がん抑制遺伝子WT1の機能発現、現代化学増刊33 「がん遺伝子研究の展望II」(1997) 第92-98頁	1-7
A	WO 96/38176 A1 (岸本忠三) 1996. 12. 05, 全文 & AU 9657796 A & JP 9-104629 A & EP 841068 A1 & US 6034235 A	1-7